

磁珠法GST pull-down试剂盒

Magnetic GST Pull-down Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IPP030 (6T)	IPP030M (12T)	IPP030L (40T)	
01	Lysis buffer	9 mL	18 mL	60 mL	4°C
02	Glutathione MagBeads	0.2 mL	0.4 mL	1.5mL	4°C
03	Incubation buffer	12 mL	24 mL	80 mL	4°C
04	Washing buffer	30 mL	60 mL	200 mL	4°C
05	Elution buffer	0.8 mL	1.6 mL	5.5mL	4°C避光
06	Protease inhibitor (100X)	35 μ L	70 μ L	0.24mL	-20°C

注意:

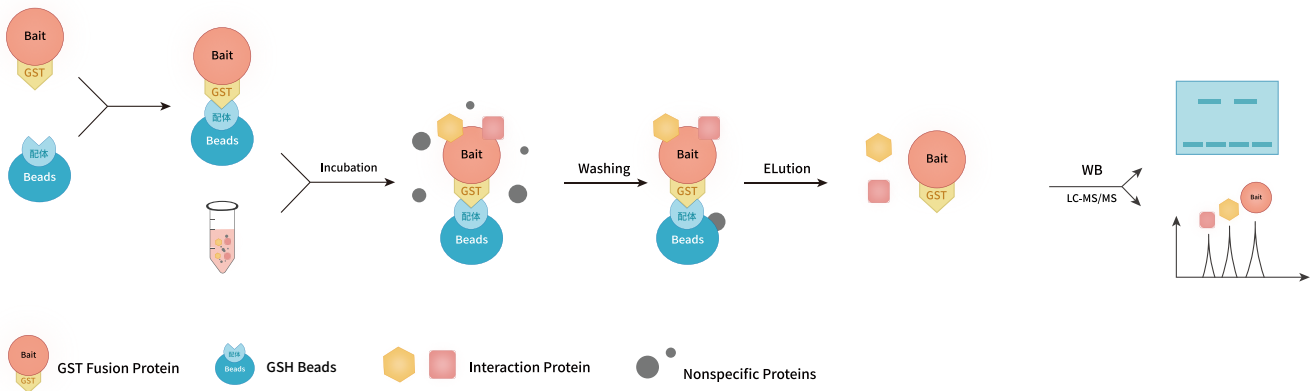
1. 需自备重组蛋白、PBS、6XLoading buffer、磁力架等试剂耗材。
2. 6T 为 6 次单组 (1 组对照或 1 组实验) pull-down 实验, 后面的操作步骤中包含了对照和实验各 1 组, 需消耗 2T 试剂。

产品简介/Product Description

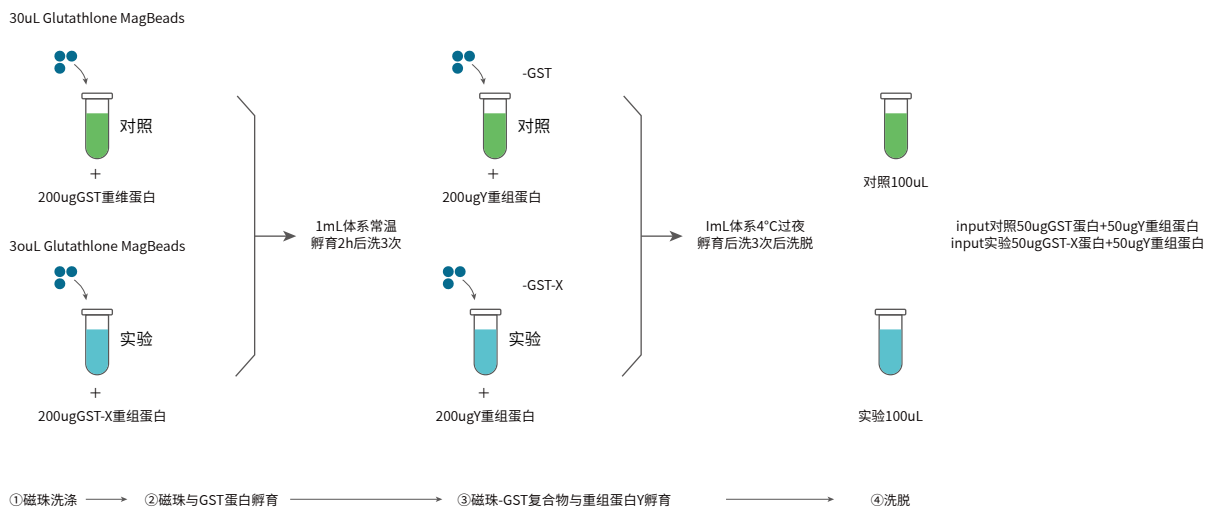
GST Pull-Down 实验基于 GST (glutathione-S-transferase), 即谷胱甘肽 -S- 转移酶蛋白, 可以与谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 结合, 将 GSH 固定于磁珠上, 形成 GSH- 磁珠, 将已知蛋白 X 与 GST 融合表达, 获得的 GST-X 蛋白可与 GSH- 磁珠结合, 若体系中存在与 X 蛋白互作的蛋白 Y, 则会形成“磁珠-GSH-GST-X-Y”复合物, 与 X 蛋白互作的蛋白即可被分离并检测。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



2. 技术流程图



使用流程/Procedure

1. 提取 (选做, 若为 2 个重组蛋白验证互作则不做蛋白提取步骤, 从 2 步骤开始)

(1) 细胞样本

- ①洗涤: 预冷的 1mL PBS 洗涤样品 (约 2×10^7 个细胞) 2 次, 最后一次尽量吸干 PBS;
- ②裂解: 根据细胞量加入 990 μ L Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor (100 \times) 冰上充分裂解 20~30min, 每隔 5min 上下颠倒混匀 1 次;
- ③超声: 用超声波细胞破碎仪超声 5min, 功率 20%, 超声 3s, 间歇 3s, 冰浴超声;
- ④离心: 4 $^{\circ}$ C 12000rpm, 10min, 收集上清。

(2) 组织样本

- ①研磨: 取新鲜组织或低温组织 (约 0.3g), 置于灭菌后预冷的研钵中, 用液氮研磨至粉状;
- ②裂解: 取 990 μ L Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor (100 \times), 混匀作为裂解液, 吸取 800 μ L 裂解液加入研钵, 在冰上继续研磨 5-10min 至样品成细腻的匀浆状, 转移至新的 1.5mL EP 管中, 再向研钵中加入剩余的 200 μ L 裂解液收集残留的样品, 同样转移至该 EP 管;

- ③装有样品匀浆的 EP 管在冰上充分裂解 30min，每隔 5min 上下颠倒混匀 1 次；
- ④超声：用超声波细胞破碎仪超声 8-10min，功率 20%，超声 3s，间歇 3s，冰浴超声；
- ⑤离心：4°C 12000rpm 离心10min，收集上清，再向上清中加入Lysis buffer 补充体积至1mL，混匀。

注意：蛋白提取整个过程都在冰上操作，减少高温造成的蛋白降解，超声过程中最好不要有气泡产生，减少蛋白降解。总蛋白放在 -20°C保存。

2.GST pull-down

磁珠准备

- ①将 Glutathione MagBeads 从 4°C冰箱取出，上下颠倒混匀数次，使磁珠和溶液混合均匀，分别取 30μL 到 2 个干净的 1.5mLEP 管中，记为对照和实验；
- ②加入0.5mL 预冷的 Washing buffer 重悬磁珠，置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液,用移液枪小心吸弃上清；
- ③重复步骤②2 次，共洗涤 3 次。

磁珠结合 GST-X 蛋白

- ①往实验组加入200μg GST-X 重组蛋白，对照管不加蛋白或加入200μg GST 重组蛋白；用Incubation buffer 补足体积至1mL，室温静音混合孵育 2h；
- ②将 2 管置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液,用移液枪小心吸弃上清；
- ③加入0.5mL 预冷的 Washing buffer，置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液,用移液枪小心吸弃上清；
- ④重复步骤③2 次，共洗涤 3 次。

诱饵蛋白结合互作蛋白 Y (除 GST 标签外的其他重组蛋白或总蛋白)

- ①2 管分别加入200μg Y 重组蛋白或 500-1000μg 总蛋白，加 Incubation buffer 将体积补至1mL，4°C静音混合孵育过夜 (约 16h)
- ②将 2 管置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液,用移液枪小心吸弃上清；
- ③加入0.5mL 预冷的 Washing buffer，置于磁力架上静置 1min，分离磁珠和溶液,用移液枪小心吸弃上清；
- ④重复步骤 3) 2 次，共洗涤 3 次。

洗脱

- ①2 管均加入100μL Elution buffer，沸水浴 10min，12000rpm 离心5min，取上清，加入20μL 6X Loading buffer，沸水浴 8-10min，记为对照组和实验组；
- ②另取 2支干净的 1.5mL EP 管，分别记为 Input 对照组，Input 实验组，向 Input 对照组中加入GST 重组蛋白和 Y 重组蛋白各 50μg,向 Input 实验组中加入GST-X 蛋白和 Y 重组蛋白各 50μg (若为总蛋白则加入100μL)，加入1/5 体积 6X Loading buffer，沸水浴 8-10min。
- ③对照组、实验组、Input 对照、Input 实验置于 -20°C保存备用。

3.WB

各取 30μL 对照、实验、Input 对照、Input 实验，开展 SDS-PAGE 和 Westernblot 检测。

4. 银染 (选做)

- ①取 30μL 对照、30μL 实验、2μLInput 对照、2μLInput 实验，开展 PAGE 凝胶电泳。
- ②固定：将电泳后的凝胶从玻璃板上剥离下来，清水冲洗干净，放入干净的直径 12cm 玻璃皿中，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 5min，弃掉去离子水，加入固定液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 30min。
- ③致敏：弃掉固定液，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 5min，重复水洗一次，共 2 次，加入致敏液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 30min。
- ④染色：弃掉致敏液，加入去离子水没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 2min，重复水洗一次，共 2 次，加入染色液没过胶，盖上盖子，在脱色摇床上室温摇晃 20min。

显色: 弃掉染色液, 加入去离子水没过胶, 盖上盖子, 在脱色摇床上室温摇晃 1min, 重复水洗一次, 共 2 次, 加入显色液没过胶, 在脱色摇床上室温摇晃 2min 左右, 溶液变浑浊, 弃掉液体, 加入新的显色液继续显色至目的条带清晰, 拍照。

5. 质谱 (选做)

取 30 μ L 对照和实验组蛋白样品开展 LC-MS 检测。

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内;
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

